

集成論文：

組換えヒト腫瘍壊死因子 (rH-TNF) と hyperthermia の併用効果に関する研究

梅 野 寛

札幌医科大学医学部内科学第4講座 (主任 新津洋司郎 教授)

Thesis:

Study on the Synergistic Effects of Recombinant Human TNF and Hyperthermia

Hiroshi UMENO

*4th Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief: Prof. Y. NITSU)*

ABSTRACT It was attempted to increase the anti-tumor activity of recombinant human tumor necrosis factor (rH-TNF) by combining it with hyperthermia in vitro and in two murine models.

L-M cells were incubated with rH-TNF (1~10000 JRU/ml) at 38.5°C or 40°C for 1 hr, 6 hrs and 12 hrs. Cytotoxicity was not enhanced more than that obtained under incubation at 37°C for 1 hr, but a synergistic effect was observed after 6 hrs and 12 hrs. An apparent, though not significant, synergism of hyperthermia (40°C 30 min, 3 times) and rH-TNF (100 JRU/mouse, 3 times) was found against subcutaneously inoculated Meth-A tumors in BALB/c mice.

The synergism with hyperthermia (40°C 30 min) became significant at dosages of rH-TNF of 300 JRU/mouse (three administrations) or 1000 JRU/mouse. Necrotic change of the inoculated Meth-A tumors caused by rH-TNF was also enhanced by hyperthermia.

The synergistic effect was further confirmed in an artificial metastasis model. The number of metastatic nodules on the surface of lung from the mouse inoculated with Meth-A F15 cells was significantly ($p < 0.01$) decreased by treatment with hyperthermia and rH-TNF as compared to the results by either hyperthermia or rH-TNF alone.

TNF-receptor complex on L-M cells internalized more rapidly at 38.5°C than at 37°C. Production of hydroxyl radicals and activity of lysosomal enzymes (acid phosphatase, β -glucuronidase) of the cells treated with rH-TNF (100 JRU/ml) were enhanced by increasing the incubation temperature from 37°C to 42°C. These results indicate that various intracellular events closely linked to the cytotoxicity of rH-TNF had been stimulated by hyperthermia.

Both blood flow and permeability of subcutaneously inoculated Meth-A tumors as measured by a laser flowmeter and leakage of Evans Blue were synergistically increased, reflecting damage of tumor blood vessels under this combination.

Therefore, combined treatment of rH-TNF and hyperthermia appear to inflict significant damage on tumor cells and tumor blood vessels. This effect appeared in both subcutaneous and metastatic

この学位論文は「緒言」の項に記した4編の論文内容を骨子として作成されており、図表の引用は、出版元の許可を得ている。

This thesis is based on the four papers that are indicated in the Introduction. The publishers granted permission for use of the citations in the tables.

tumors in mice. This modality seems to have potential for clinical trial.

(Received December 26, 1995 and accepted January 4, 1996)

Key words: rH-TNF, Hyperthermia, Combination therapy, Anti-tumor, Cytotoxicity

1 緒 言

腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor; TNF)は、マウス移植腫瘍に対し壊死を生じさせる因子として発見された抗腫瘍性のサイトカインである⁵⁾。これまでに、種々の動物由来の TNF 遺伝子がクローニングされ^{6,7)}、既に、遺伝子組換え技術により大腸菌を使って recombinant human TNF (rH-TNF) が生産されている。この rH-TNF は、癌患者から得た腫瘍細胞⁸⁾ および培養細胞株^{9,10)} に対し強力な腫瘍細胞傷害性を発揮し、さらに腫瘍移植マウスを用いた *in vivo* の実験においても、腫瘍増殖抑制効果^{5,11)} や肺転移抑制効果¹²⁾ を示すことが明らかにされている。

これらの基礎実験をもとに、rH-TNF の臨床応用¹³⁾ が試みられたが、これまでのところ、腫瘍内投与などの局所投与¹⁴⁾ では高い奏効率が得られているものの、全身投与では発熱、血圧低下などの副作用^{15,16)} のため、動物実験から換算して効果を期待できる量の rH-TNF の投与が出来ず、満足すべき効果が得られていない。そこで、rH-TNF の抗腫瘍効果を増強する目的で、他のサイトカイン¹⁷⁻¹⁹⁾ や各種化学療法剤²⁰⁾ などとの併用が試みられているが、臨床ではまだ十分な成果が得られているとは言えない。

ところで、rH-TNF による細胞傷害は、rH-TNF が receptor²¹⁾ と結合したのち、様々な signal transduction を惹起し、結果として生じる hydroxyl radical²²⁻²⁴⁾ や lysosomal enzyme の活性化²²⁾ などによって、発揮されることが明らかになりつつある。こういった intracellular event は、当然化学反応に基くものであり、したがって温度によってそれが促進されることは想像に難くないところである。一方、腫瘍が正常組織に比べて温度に対し感受性が高いという観察を通して、すでに hyperthermia が癌治療の 1 つの modality として、ある一定の位置を得つつある^{25,26)}。

そこで本研究では、rH-TNF を hyperthermia と併用することにより抗腫瘍性相乗効果が得られるのではないかと想定し、以下に述べる検討を行った。

<集成した原著論文リスト>

なお、本論文は以下の 4 編の原書をまとめた集成論文である。

- 1) Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res* 1988, 48: 650-653.
- 2) Niitsu Y, Watanabe N, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Synergistic effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia on *in vitro* cytotoxicity and artificial metastasis. *Cancer Res* 1988, 48: 654-657.
- 3) Yamauchi N, Watanabe N, Maeda M, Okamoto T, Sasaki H, Tsuji N, Tsuji Y, Umeno H, Akiyama S, Niitsu Y. Mechanism of synergistic cytotoxic effect between tumor necrosis factor and hyperthermia. *Jpn J Cancer Res* 1992, 83: 540-545.
- 4) Umeno H, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji N, Okamoto T, Niitsu Y. Enhancement of blood stasis and vascular permeability in Meth-A tumors by administration of hyperthermia in combination with tumor necrosis factor. *Jpn J Cancer Res* 1994, 85: 325-330.

2 方 法

2.1 rH-TNF

Recombinant human tumor necrosis factor (rH-TNF) は旭化成工業(東京)より供与を受けた。本 rH-TNF の比活性は約 2.3×10^6 JRU (Japan Reference Unit²⁷⁾)/mg protein であり、endotoxin 濃度は 10 pg/10⁶ JRU 以下であった。

2.2 細胞培養と細胞傷害性の測定

rH-TNF の細胞傷害性試験の標的細胞として用いたマウス線維芽細胞由来 L-M 細胞 (ATCC CCL 137, Rockville, U. S. A.) は、10% fetal calf serum (FCS, Flow Lab., North Ryde, Australia) 加 Eagle's minimal essential medium (Eagle's MEM, 日本製薬,

東京)中で、37°C、5%CO₂の条件にて培養した。このL-M細胞(1×10⁵個/ml)をmicroculture plate(住友ベークライト、東京)の各wellに0.1 ml/wellずつ分注した後、rH-TNF(最終濃度:0.1~10⁴ JRU/ml)を0.1 ml/wellずつ加え、あらかじめ37°C、38.5°C、40°Cに調節しておいたincubator内で1, 6, 12時間加温した。加温後、rH-TNF-freeの10% FCS加Eagle's MEMでさらにそれぞれ47, 42, 36時間(合計48時間)37°C、5%CO₂ incubator内で培養を行った。細胞傷害性の判定は、培養終了後dye uptake法で行った²⁷⁾。

2.3 Meth-A細胞皮内移植マウスにおける抗腫瘍効果の判定

2.3.1 Meth-A細胞皮内移植マウス

BALB/cマウス(雌、4~6週齢)は日本クレア(東京)または日本チャールズリバー(神奈川)より購入し、飼育はSPF(室温25±2°C)条件下で行った。マウス線維肉腫由来Meth-A細胞の継代はBALB/cマウス腹腔内で行い、Eagle's MEMで1×10⁷ cells/mlに調整後、BALB/cマウスの腹部皮下に1×10⁶ cells/mouse移植した。

2.3.2 rH-TNFの投与

rH-TNFはMeth-A細胞移植後、腫瘍径が6~8 mmに達した6日目に1000 JRU/mouseあるいは6, 10, 4日目に100または300 JRU/mouse尾静脈より投与した。

2.3.3 Hyperthermia

加温装置は、直径7 mmの穴を16個あけた50 ml falcon tube (Becton Dickinson, New Jersey, U. S. A.)をwater bath内に固定したものを作製、使用した。rH-TNFまたは対照のsalineあるいは0.1% gelatin(和光純薬、大阪)を含むphosphate-buffered saline (pH 7.4: vehicle)を静脈内投与後、直ちにマウスをあらかじめ40°Cに調整したwater bath内のfalcon tubeに腫瘍部位が完全に浸るように固定し、30分間加温した。サーミスタ温度計(TM54: Inter Nova Co., 東京)にて、マウスの直腸温度(肛門から2 cmの部位)および腫瘍内温度(腫瘍表面から3 mmの部位)をモニターした。なお、rH-TNFの投与およびhyperthermiaは、すべてsecobarbital sodium(24 mg/kg, i. p., 吉富製薬、大阪)麻酔下で行った。

2.3.4 抗腫瘍効果の判定

rH-TNF投与およびhyperthermia施行後、necrotic responseおよび腫瘍の短径(a)と長径(b)を測定した。推定腫瘍重量は $a^2 \times b/2$ で算出し²⁸⁾、治療

開始時の推定腫瘍重量との比を求め、腫瘍増殖の指標とした。Necrotic responseは、その程度を(+++):腫瘍全体の壊死、(++):50%以上の壊死、(+):壊死が認められたものとして判定した。

2.3.5 病理組織学的検索

摘出した皮下腫瘍をホルマリン固定し、パラフィンブロック作製後、薄片を切り出した。その後、ヘマトキシリン-エオジン二重染色を実施し、光学顕微鏡下での病理組織学的検索を行った。

2.4 肺転移抑制効果の判定

Meth-A細胞の高肺転移株であるMeth-A F15細胞の培養は、10% FCS加RPMI 1640 medium (Gibco, Grand Island, U. S. A.)を用い、37°C、5% CO₂ incubator内で行った。Meth-A F15細胞をBALB/cマウスの尾静脈内に5×10⁵ cells/mouse投与し、さらに2日後または2日後と4日後にrH-TNF(300 JRU/mouse)あるいはsaline(0.1 ml/mouse)を投与したのち、ただちにhyperthermiaを施行した。Hyperthermiaは、“2.3.3 Hyperthermiaの方法”で述べた方法により行った。腫瘍細胞投与後14日目に肺を摘出し、肺表面転移結節数を測定した^{29,30)}。

2.5 TNFのreceptor数の測定

¹²⁵I標識TNFの作製はBolton and Hunter³¹⁾の方法に従った。得られた¹²⁵I標識TNFの比活性は2.4×10⁵ cpm/μgであった。Binding assayは、あらかじめ37°C、38.5°Cで2時間加温しておいたL-M細胞(4×10⁵ 個/well)に5 nM ¹²⁵I標識TNFおよび500 nM非標識TNFを加え、4°C、1時間incubationすることにより行い、TNF receptor数および解離定数(Kd値)をScatchard plot analysis³²⁾により算出した。

2.6 rH-TNFの内包化と細胞内動態の解析

細胞内動態の解析は、L-M細胞(6×10⁵ 個/well)に5 nM ¹²⁵I標識TNFおよび500 nM非標識TNFを加え、37°C、38.5°Cで5, 10, 20分間培養したのち、培養上清0.5 mlに20% trichloroacetic acid (TCA: 和光純薬、大阪)0.5 mlを加え、TCA-soluble分画の放射活性を細胞外放出量(degradation product)とし、さらに、細胞を0.2% trypsin(和光純薬、大阪)1 mlで処理した際に、上清中に遊離してくる放射活性を細胞表面への結合量(binding)、上清中に遊離してこない放射活性を細胞内取り込み量(internalized)とし、各分画の放射活性を測定することにより行った³³⁾。

2.7 Lysosomal enzyme 活性の測定

Miskimins and Shimizuの方法³⁴⁾にてL-M細胞のcell lysateを作成した後、acid phosphatase活性、

β -glucuronidase 活性を、それぞれ Shibko らの方法³⁵⁾, Kato らの方法³⁶⁾ に準じて測定した。

2.8 Hydroxyl radical 産生の測定

Hydroxyl radical 産生量は、同 radical が dimethyl sulfoxide (DMSO, 和光純薬, 大阪) と反応した結果生じるメタン量から推定した³⁷⁾。すなわち、L-M 細胞 (2×10^7 cells/ml) 1 ml と 2 M DMSO 0.8 ml を siliconize した 3.5 ml ガラスバイアル (Pierce, Rockford, U. S. A.) に入れ, siliconized Teflon septum と open top screw cap で密封し固定した後, rH-TNF100 JRU/ml を含む 0.2 ml 20 mM HEPES medium (和光純薬, 大阪) を 0.5 ml syringe にて Teflon septum を通して注入した。このバイアルを shaking water bath 中で 37°C, 18 時間, または 42°C, 1 時間反応させた後, さらに 37°C, 17 時間の反応を行ない, ただちに氷冷して反応を停止させ, バイアル中の head space gas 0.2 ml を gas-tight syringe (Hamilton, Reno, U. S. A.) で採取した。同 syringe 中のメタンを, active carbon 60/80 を充填した 3 mm \times 2 m ステンレスカラム (ガスクロ工業, 東京) を装着したガスクロマトグラフィー (GC-9A, 島津製作所, 京都) にて測定した²³⁾。検出器は frame ionization detector を使用し, キャリアガスは窒素を流速 50 ml/min で流した。インジェクター, カラム, および検出器の温度はそれぞれ 200°C, 150°C, 200°C とした。サンプル中のメタン量は, calibration curve と比較して求めた値から実験室空気中のメタン量 (14.2~18.2 pmol/0.2 ml) を差し引いて算出した。

2.9 血管透過性の測定

rH-TNF および hyperthermia の施行開始の 35, 50, 80, 110 分後に, エバンスブルー (50 mg/kg : 和光純薬, 大阪) をマウスの尾静脈から投与し, その 10 分後にマウスを頸椎脱臼にて屠殺し, 腫瘍部位および正常皮膚部位を切除した。各々の組織を DMSO 1.2 ml に 24 時間浸すことにより色素を抽出し, 吸光度計 (UV-160, 島津製作所, 京都) を用いて測定した 620 nm の吸光度を単位重量あたりの値に換算し, エバンスブルーのみを投与した腫瘍での値を 1.0 として比率を算出した。

2.10 血流量の測定

Meth-A 細胞皮内移植マウスの腫瘍中央部位および正常皮膚部位の血流量を, Aukland らの方法³⁸⁾ に準じて, レーザー組織微小循環血流量計 (ALF2100, Unique Medical Co., 東京) により測定した。プローブを腫瘍表面あるいは正常皮膚表面に付着させたのち, rH-TNF および hyperthermia の施行前および施行開始から 0.5, 1, 2, 4 時間後に血流量を測定し, 施行前値を 1.0 としてその割合を算出した。

3 結 果

3.1 rH-TNF と hyperthermia の抗腫瘍性相乗効果

3.1.1 In vitro における rH-TNF と加温の細胞傷害性相乗効果

まず, L-M 細胞を 37°C で培養したときの, rH-TNF 単独による細胞傷害性を検討した。同細胞に, rH-TNF (1~10000 JRU/ml) を添加し 1 時間 (Fig. 1-A) 培養したところ, 用量依存的に細胞傷害が発揮された。

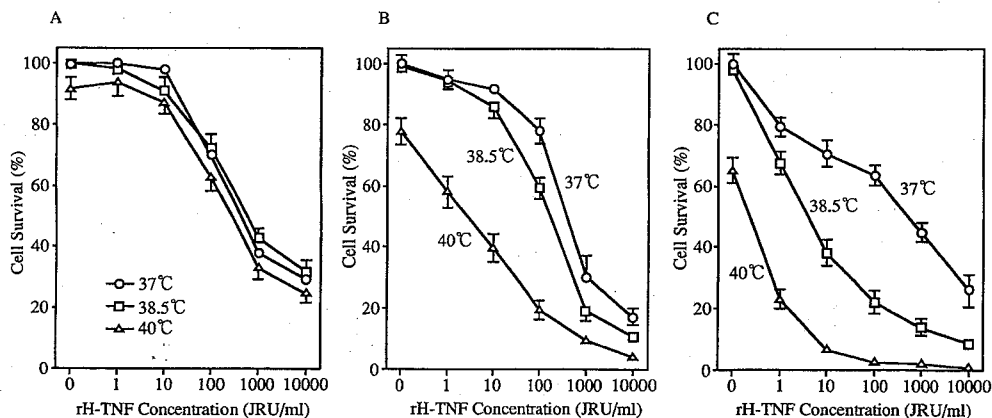


Fig. 1 Influence of hyperthermia on rH-TNF cytotoxicity. Determination of cell survival was done by the dye uptake method after incubation of L-M cells with 0 to 10000 JRU/ml of rH-TNF at 37, 38.5, and 40°C for 1, 6, and 12 h and then in rH-TNF-free medium at 37°C for 47 (A), 42 (B), and 36 (C) h. bars, SE.

50% cytotoxicity (IC_{50}) は 460 JRU/ml であった。この IC_{50} は、rH-TNF の添加時間を、6 時間 (Fig. 1-B)、12 時間 (Fig. 1-C) と増加させても、それぞれ 420, 500 JRU/ml と、1 時間添加時と有意差がみられなかった。

次に、L-M 細胞に対する加温単独の影響を検討した。37°C 48 時間培養したときの細胞生存率を 100% とすると、培養最初の 1 時間、6 時間または 12 時間を 38.5°C に換えても細胞増殖にはなにも影響はなかった。それらを 40°C に換えた場合、細胞生存率はそれぞれ 91.9%, 78.0%, 65.2% へと低下していた。

そこで、rH-TNF 添加と同時に加温、つまり培養温度を 38.5°C あるいは 40°C に上昇させて細胞傷害性を検討したところ、培養温度に依存して上昇した。すなわち、加温単独では影響がみられなかった 38.5°C を併用した場合、rH-TNF の IC_{50} は 1 時間添加では 37°C のときと比べて差異はみられなかったものの、6 時間添加、12 時間添加ではそれぞれ 160 JRU/ml (1/2.6 倍)、4.0 JRU/ml (1/125 倍) と相乗的に低下していた。また、単独で細胞傷害性がみられる 40°C の場合、1 時間添加では加温単独時と差異はみられなかったが、6 時間添加、12 時間添加ではそれぞれ 14.2 JRU/ml (1/29.6 倍)、1 JRU/ml 以下 (1/500 倍以上) とさらに低下していた。

3.1.2 *In vivo* における rH-TNF と hyperthermia の抗腫瘍性相乗効果

3.1.2.1 皮内移植 Meth-A 腫瘍に対する相乗効果

Meth-A 担癌マウスに腫瘍増殖抑制を惹起しうる最低 rH-TNF 濃度は、1000 JRU/mouse とされている³⁹⁾。そこで本研究では、hyperthermia との相乗効果をみるために、rH-TNF 1000 JRU/mouse 以下の濃度、つまり 1000, 300, 100 JRU/mouse の 3 dose について検討することとした。

まず、Meth-A 細胞を移植して 6 日目に、rH-TNF (1000 JRU/mouse) と hyperthermia を施行したときの腫瘍増殖抑制を検討した (Fig. 2)。6 日目の腫瘍の大きさを 1.00 とすると、対照群である saline 投与群の腫瘍は移植 10 日目には 1.93 [以下、全て腫瘍サイズ比で示す]、15 日目には 3.12、18 日目には 6.28 に増殖した。一方、rH-TNF 1000 JRU/mouse 単独投与群では移植 10 日目には 1.32 (抑制率: 31.6%)、15 日目には 2.27 (抑制率: 27.2%)、18 日目には 4.26 (抑制率: 32.2%) と軽度の腫瘍増殖抑制効果がみられたが、hyperthermia 単独施行群では、移植 10 日目、15 日目、18 日目にそれぞれ 1.71 (抑制率: 11.4%)、3.24 (抑制率: 0%)、5.33 (抑制率: 15.1%) と、対

照群に比べ差異はなかった。併用群では、腫瘍は移植 10 日目に 0.59 (抑制率: 69.4%)、15 日目に 0.14 (抑制率: 95.5%) となり、移植 18 日目には 5 匹すべてに完全治癒が認められ、rH-TNF 単独群に比べ著明な腫瘍増殖抑制効果の増強がみられた。

また、Meth-A 腫瘍に対する抗腫瘍効果のもう 1 つの目安である壊死の判定を行った。Table 1 に示すように、hyperthermia 単独施行群では、壊死の発現はみら

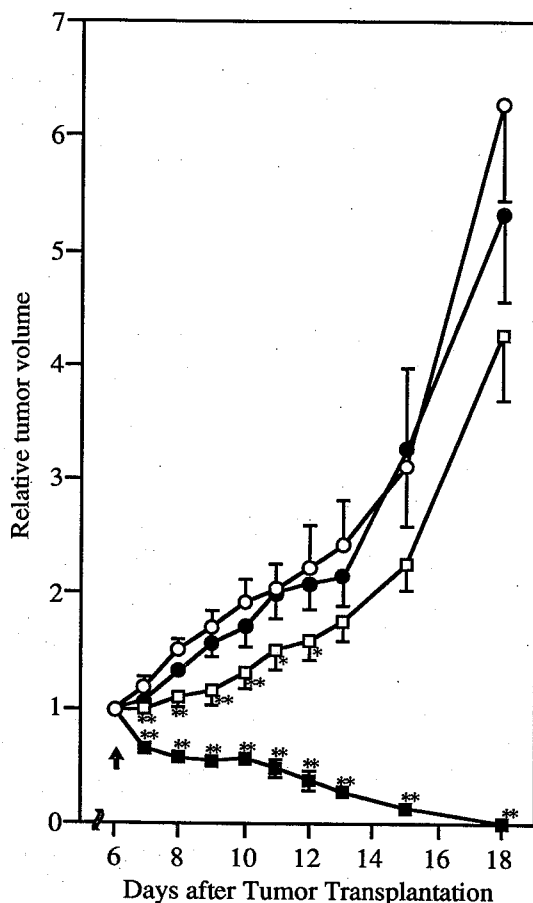


Fig. 2 Effect of single rH-TNF injection of 1000 JRU/mouse and hyperthermia in combination on tumor growth in BALB/c mice after transplanting of Meth-A fibrosarcoma cells at 1×10^6 cells/mouse. Administration of rH-TNF at 1000 JRU/mouse on sixth day following transplanting was done with or without hyperthermia at 40°C for 30 min; ○, saline, 0.1 ml/mouse; ●, hyperthermia only; □, rH-TNF only; ■, rH-TNF and hyperthermia. Plots, mean \pm SE (bars); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t* test; arrow, the period of rH-TNF administration and hyperthermia.

Table 1 Effect of rH-TNF (1000 JRU/mouse) and hyperthermia in combination on necrotic response and cure rate

Treatment	n	Necrotic Response				Complete cure(%)
		—	+	++	+++	
Saline	11	11	0	0	0	0/11(0)
Saline+hyperthermia	5	5	0	0	0	0/5(0)
TNF	10	1	7	2	0	0/10(0)
TNF+hyperthermia	5	0	0	0	5	5/5 (100)

れなかった。また、rH-TNF(1000 JRU/mouse)単独投与群では9/10(90.0%)のマウスに部分壊死(+,++)がみられたが、完全壊死(+++)は認められなかった。ところが、両者併用群では5/5(100.0%)のマウスに完全壊死が認められた。

次に、rH-TNFの用量を下げて、rH-TNF(300 JRU/mouse)とhyperthermiaを施行したときの腫瘍増殖抑制効果を検討した(Fig. 3)。Saline投与群が移植10日目には2.15にまで増殖したのに対し、hyperthermia単独群は2.17と、増殖抑制作用はみられなかった。一方、rH-TNF単独群では1.62(抑制率:24.7%)と若干の抑制がみられたが、併用群も1.60(抑制率:25.6%)であり、hyperthermia併用による増殖抑制作用の増強は認められなかった。そこで、さらに10日目、14日目に両処置を繰り返すことにした。Saline投与群は18日目で5.52であったのに対し、hyperthermia単独施行群では5.48(抑制率:0.7%)と抑制作用はみられず、rH-TNF単独投与群でも4.38(抑制率:20.7%)と若干の抑制作用を認めるのみであった。ところが、両者併用群では1.75(抑制率:68.3%)と、それぞれの単独処置群に比べ著明な腫瘍増殖抑制効果がみられた。

さらに、rH-TNF 300 JRU/mouseおよびhyperthermia 3回処置の壊死効果についても移植7日目、11日目、および15日目に検討した(Table 2)。移植7日目の併用群の腫瘍は、完全壊死に至るというscore upは認められなかったものの、部分壊死がみられたincidenceは、rH-TNF単独投与群の3/6(50.0%)、hyperthermia単独施行群の2/6(33.3%)から、6/6(100.0%)と増加していた。同様に、移植11日目、15日目でも、rH-TNFとhyperthermiaの併用によるincidenceの増加が認められた。

さらにrH-TNFの用量を下げて、rH-TNF(100 JRU/mouse)で検討を行った(Fig. 4)。まず、移植6日目にrH-TNF投与あるいはhyperthermia施行を行ったところ、移植10日目にはsaline投与群の腫瘍が

2.15にまで増殖していたのに対し、hyperthermia単独施行群、rH-TNF単独投与群、および併用群はそれぞれ2.17(抑制率:0%)、2.08(抑制率:3.3%)、

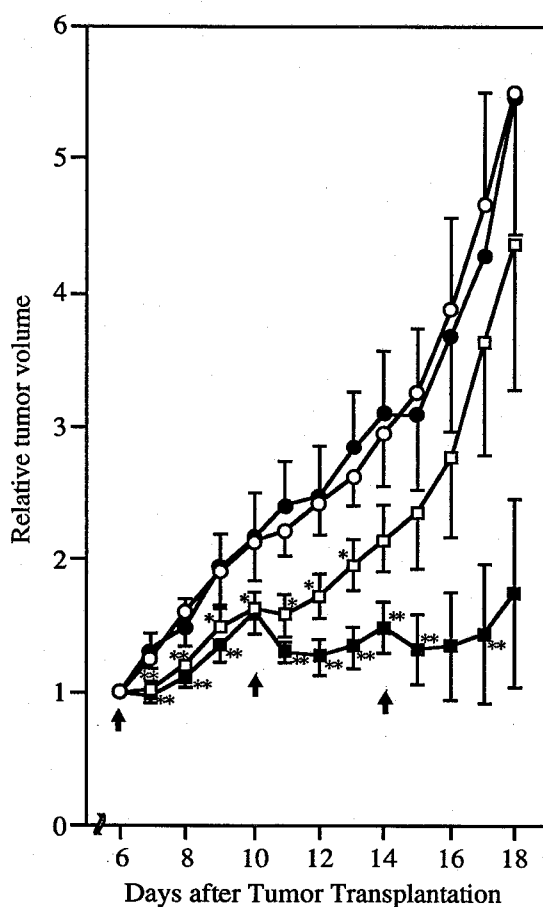


Fig. 3 Effect of multiple rH-TNF injections of 300 JRU/mouse and hyperthermia in combination on tumor growth.; rH-TNF: 300 JRU/mouse on 6th, 10th, and 14th day after transplanting; hyperthermia: 40°C for 30 min on same days; all other conditions are as in Fig. 2. Plots, mean \pm SE (bars); arrows, the period of rH-TNF administration and hyperthermia.

1.95 (抑制率: 9.3%) と、全ての群で有意な腫瘍増殖抑制効果はみられなかった。そこで、さらに 10 日目、14 日目に両処置を繰り返したところ、移植 18 日目には、saline 投与群, rH-TNF 単独投与群, hyperthermia 単独施行群はそれぞれ 5.52, 5.21 (抑制率: 5.6%), 5.48 (抑制率: 0.7%) であったのに対し、両者を併用した群は 3.35 (抑制率: 39.3%) と、著明な腫瘍増殖抑制効果がみられた。

さらに、移植 7 日目、11 日目、および 15 日目に壊死の程度を測定した (Table 2)。移植 7 日目には、rH-TNF (100 JRU/mouse) 単独投与群, hyperthermia 単独施行群, 両者併用群での部分壊死の incidence は、それぞれ 1/6 (16.7%), 2/6 (33.3%), 3/7 (42.9%) であり、わずかながら併用による増加がみられた。同様に、移植 11 日目、15 日目でも、rH-TNF と hyperthermia の併用による incidence の増加が認められた。

3.1.2.2 rH-TNF と hyperthermia の肺転移抑制効果

Meth-A F15 細胞を BALB/c マウスの尾静脈内投与した 2 日後の 1 回、あるいは 2 日および 4 日後の計 2 回、rH-TNF (300 JRU/mouse) と hyperthermia を施行し、14 日目に肺転移結節数を測定した (Table 3)。1 回施行の実験では、対照群である saline 投与群の 184.4 個に比べ、rH-TNF 単独単回投与群では 188.4 個、hyperthermia 単独単回施行では 140.1 個であり差異は認められなかった (Exp. 1)。一方、両者併用群では 106.0 個と相乗的な抑制効果が認められた。また、2 回施行の実験 (Exp. 2) では、rH-TNF と hyperthermia の併用群の肺転移結節数は 68.3 個であり、saline 2 回投与群 (153.0 個) はもとより rH-TNF 単独 2 回投与群 (157.5 個)、hyperthermia 単独 2 回施行群

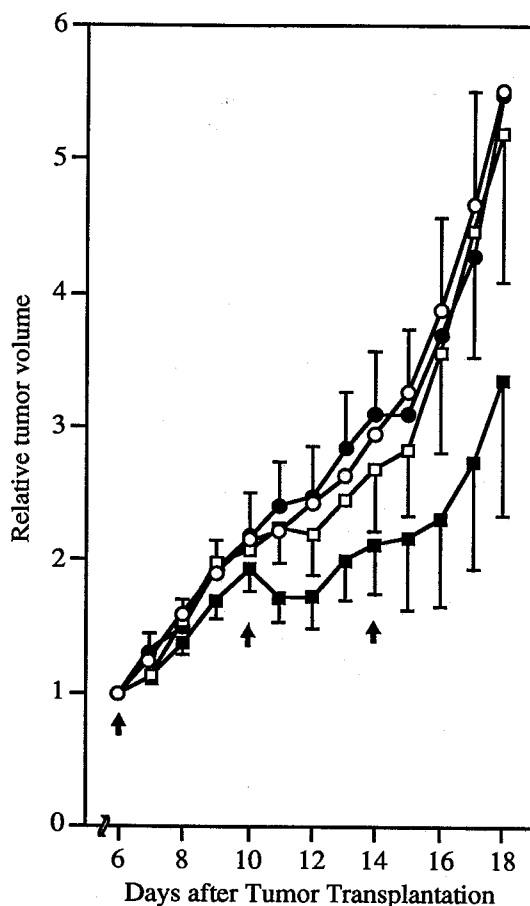


Fig. 4 Effect of multiple rH-TNF injections of 100 JRU/mouse and hyperthermia in combination. Administration of rH-TNF at 100 JRU/mouse and hyperthermia on 6 th, 10 th, and 14 th day after transplanting; all other conditions are as in Fig. 2. Plots, mean \pm SE (bars); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's *t* test; arrows, the period of rH-TNF administration and hyperthermia.

Table 2 Necrotic response to rH-TNF (100, 300 JRU/mouse) and hyperthermia in combination, as observed 7, 11, and 15 days after s. c. transplantation of Meth-A fibrosarcoma cells at 1×10^6 cells/mouse in BALB/c mice

Treatment	n	Day 7				Day 11				Day 15			
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	—	+	++	+++
Control	6	6	0	0	0	6	0	0	0	3	3	0	0
Hyperthermia	6	4	2	0	0	3	2	1	0	3	2	1	0
TNF, 100 JRU/mouse	6	5	1	0	0	5	1	0	0	3	3	0	0
TNF, 300 JRU/mouse	6	3	1	2	0	2	2	2	0	2	2	2	0
TNF, 100 JRU/mouse + hyperthermia	7	4	2	1	0	3	2	2	0	1	4	1	1
TNF, 300 JRU/mouse + hyperthermia	6	0	4	2	0	0	2	4	0	0	2	3	1

Table 3 Synergistic effect of rH-TNF and hyperthermia on pulmonary metastasis formed by *i. v.* injection of Meth-A F15 cells

	Combination therapy	Incidence of pulmonary metastasis	No. of pulmonary surface nodules (mean±SE)	% of control	
Experiment 1					
Control	—	7/7	184.4±15.7	100.0	<div><div>n. s.</div><div>n. s.</div><div>P<0.01</div></div>
Hyperthermia	Day 2	7/7	140.1±12.7	76.5	
TNF 300 JRU/mouse	Day 2	7/7	188.4±17.1	102.2	
TNF 300 JRU/mouse+ hyperthermia	Day 2	7/7	106.0± 4.4	57.5	
Experiment 2					
Control	—	9/9	153.0±10.8	100.0	<div><div>n. s.</div><div>n. s.</div><div>P<0.01</div></div>
Hyperthermia	Day 2 and 4	8/8	129.1±12.9	84.4	
TNF 300 JRU/mouse	Day 2 and 4	9/9	157.5±11.8	103.0	
TNF 300 JRU/mouse+ hyperthermia	Day 2 and 4	8/8	68.3± 9.3	44.6	

^an. s., not significant.

(129.1 個) に対しても有意 ($p < 0.01$) の抑制効果が認められた。

3.2 rH-TNF と hyperthermia の抗腫瘍性相乗効果の機序

3.2.1 加温による rH-TNF の internalization の促進

37°C および 38.5°C 30 分加温した際の L-M 細胞表面 TNF receptor 数はそれぞれ $8.8 \times 10^3/\text{cell}$, $8.9 \times 10^3/\text{cell}$ で、解離定数はともに $5.7 \times 10^{-10}\text{M}$ であり、両者間に差異は認められなかった (Table 4)。

加温による receptor 数に変化がみられなかったため、次に、37°C および 38.5°C における ^{125}I 標識 TNF の receptor 結合量、細胞内取り込み量、および細胞外排出量を経時的に検討した。その結果、receptor 結合量、細胞内取り込み量には差異は認められなかったが、5 分および 10 分後の細胞外排出量は 37°C に比べ 38.5°C で有意 ($P < 0.05$) に増加していた (Fig. 5)。

3.2.2 rH-TNF と加温の併用による lysosomal enzyme 活性の増強

我々は、rH-TNF が細胞傷害性を発揮するときに、lysosomal enzyme 活性が高まることを報告している²²⁾。そこで、lysosomal enzyme のうち acid phosphatase と β -glucuronidase を取り上げ、rH-TNF と加温を併用したときにこれらの酵素活性が亢進されるか否かについて検討した (Fig. 6)。rH-TNF 単独添加群または加温単独施行群の acid phosphatase 活性は、非処置群のそれに比べてそれぞれ 1.22 倍、1.17 倍に増加した。両者併用群では、非処置群の 1.72 倍とさらに増加した。

同様に、 β -glucuronidase 活性も、rH-TNF 単独添加群、加温単独施行群、両者併用群で非処置群に比べてそれぞれ 1.09 倍、1.14 倍、1.77 倍と、後者で最も亢進していた。

3.2.3 rH-TNF と加温の併用による hydroxyl radical 産生の増強

我々は、rH-TNF が細胞傷害性を発揮する際、hydroxyl radical 産生が高まることを報告している²²⁻²⁴⁾。そこで、rH-TNF と加温を併用したとき、hydroxyl radical と DMSO の反応産物であるメタン産生が増加するか否かについて検討した (Fig. 7)。非処置群におけるメタン産生が $16.0 \text{ pmol}/2 \times 10^7 \text{ cells}$ であったのに対し、rH-TNF 100 JRU/ml 単独添加群または加温単独施行群では、それぞれ $25.7 \text{ pmol}/2 \times 10^7$

Table 4 TNF receptors on the surface of L-M cells pretreated with hyperthermia

Pretreatment	TNF receptor	
	No./cell $\times 10^3$	Kd ($\times 10^{-10}\text{M}$)
37°C		
30 min	8.8	5.4
6 h	8.9	5.5
12 h	8.7	5.6
38.5°C		
30 min	8.9	5.7
6 h	8.3	5.4
12 h	8.5	5.6

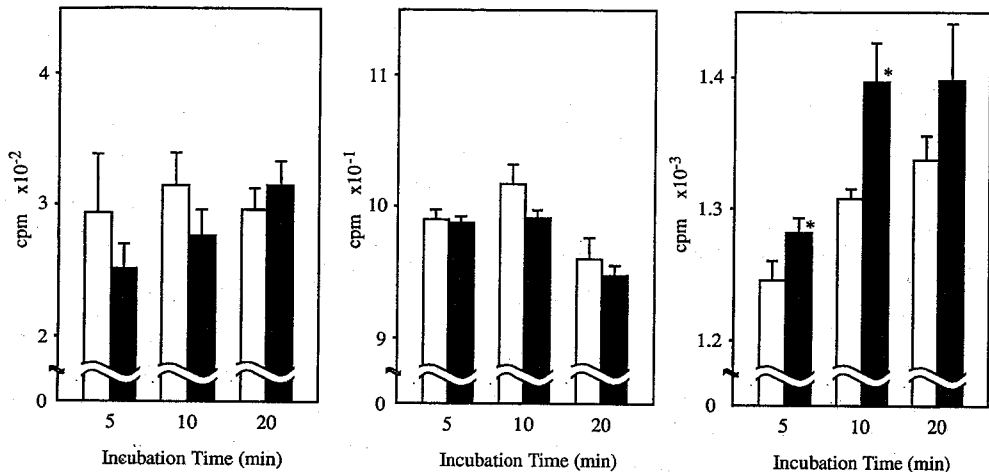


Fig. 5 Time course of binding (left), internalization (middle), and degradation (right) of ^{125}I -labeled rH-TNF to L-M cells at 37°C and 38.5°C. L-M cells (6×10^5 cells/well) were incubated with 5 nM ^{125}I -labeled rH-TNF at 37°C (□) and 38.5°C (■) for the indicated time. Cell-associated radioactivity not released by treatment with trypsin was measured as described in "Materials and Methods". Radioactivity soluble in 10% TCA was also measured in the culture medium. Plots, mean \pm SE (bars). * $P < 0.05$; by Student's *t* test in comparison with the 37°C value.

cells, 34.3 pmol/ 2×10^7 cells と増加した. rH-TNF と加温を併用した群のメタン産生は, さらに 52.5 pmol/ 2×10^7 cells へと著増した.

3・2・4 rH-TNF と hyperthermia の併用による腫瘍血管傷害作用の増強

3・2・4・1 色素抽出法およびレーザー血流量計による血管傷害性測定の妥当性

我々は, Meth-A 腫瘍を移植したマウスに rH-TNF (5×10^6 JRU/kg) を尾静脈内投与すると, 腫瘍内血管に傷害が起こることを, 透明窓を用いて確認し, それ

が腫瘍壊死の一因であると想定した⁴⁰⁾. その後, この rH-TNF による血管傷害には, 少なくとも透過性亢進^{41,42)}と充鬱血⁴³⁾の 2 つの factor が関与していることが明らかにされている. そこで, hyperthermia 併用による rH-TNF の血管傷害の増強作用を, 血管透過性

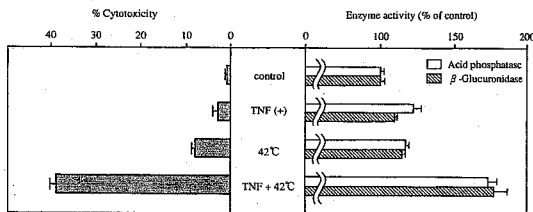


Fig. 6 Effects of hyperthermia on rH-TNF susceptibility and lysosomal enzyme activity of L-M cells. Cells were incubated with or without rH-TNF (100 JRU/ml) for 4 h. Heat treatment (42°C) was administered for the first hour. After 4 h culture, % cytotoxicity and enzyme activity were measured by the method described in "Materials and Methods." Values are the mean \pm SD of three separate experiments.

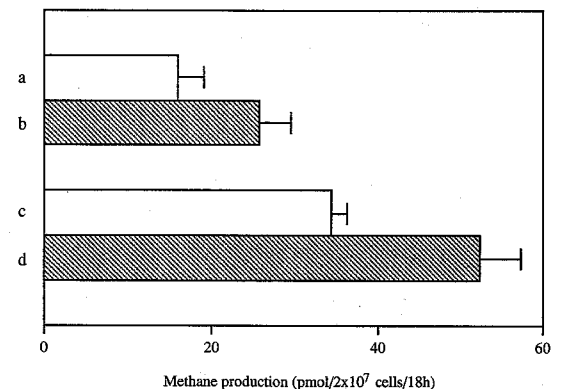


Fig. 7 Effects of hyperthermia on the production of methane by L-M cells incubated with rH-TNF. L-M cells (2×10^7 cells/2 ml) were incubated for 18 h at 37°C (a, b) or 42°C (c, d) in medium containing 400 mM DMSO with (b, d) or without (a, c) rH-TNF (100 JRU/ml). The methane produced was assessed by gas chromatography as described in "Materials and Methods." Values are the mean \pm SD of three separate experiments.

と充鬱血の両面から調べることにした。つまり、血管透過性を色素抽出法で、充鬱血の程度をレーザー血流量計によって定量化した。本実験に先立ち、まず、これらの方法の妥当性を検討した。

rH-TNF を 0.5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg と、dose を 3 段階に上げて投与した後、エバンスブルーを投与したところ、rH-TNF の用量依存的に色素の漏出が肉眼的に認められた (Fig. 8 lower). 直ちに腫瘍を切除、色素を抽出し、単位組織あたりの色素量を吸光度で測定したところ、それぞれ 1.03 倍、1.13 倍、1.27 倍、1.35 倍と増加していた (Fig. 8 upper). すなわち、肉眼的に判定された色素の漏出の程度と色素抽出法で得られた値には相関関係が認められた。

一方、同量の rH-TNF を投与したマウスから腫瘍を摘出し、その病理組織像を検討したところ、rH-TNF の用量依存的に充鬱血の増強が認められた (Fig. 9 lower). 同様な処置を施したマウスの移植腫瘍内血流量 (レーザー血流量計による) は、1.01, 0.97, 0.60, 0.51 と低下していた (Fig. 9 upper). すなわち、病理組織による充鬱血の増加と、血流量計で得られる値の低下が、よく相関していた。このことから、色素量抽出法や血流量測定法により、それぞれ血管透過性の変

化や充鬱血の程度を定量的に測定できることが示唆された。

3・2・4・2 正常皮膚組織での rH-TNF と hyperthermia の併用による血管傷害作用

rH-TNF (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg) あるいは hyperthermia が正常皮膚の血管透過性を増加するかどうかについて検討した (Fig. 10, 11). rH-TNF (5×10^3 , 5×10^4 JRU/kg) 単独投与群や hyperthermia 単独施行群では血管透過性は変化がみられなかったが、rH-TNF (5×10^5 JRU/kg) 投与群では色素抽出法で示される血管透過性の増加がみられ、投与 60 分、90 分後には投与前に比べそれぞれ 1.13 倍、1.21 倍に増加していた。一方、rH-TNF (5×10^3 JRU/kg) と hyperthermia の併用群では血管透過性に変化はみられなかったものの、rH-TNF (5×10^4 JRU/kg) と hyperthermia の併用群の血管透過性は 60 分後、90 分後には投与前に比べそれぞれ 0.98 倍、1.26 倍、rH-TNF (5×10^5 JRU/kg) と hyperthermia の併用群ではそれぞれ 1.33 倍、1.46 倍と有意 ($p < 0.05$) に増加していた。

次に、rH-TNF (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg) あるいは hyperthermia が正常皮膚の血流量に与える影

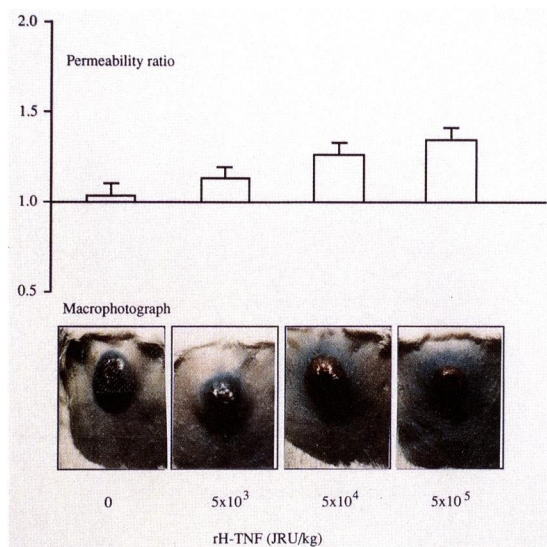


Fig. 8 Comparison of vascular permeability (upper) and macrophotographic appearance (lower) of Meth-A tumors following rH-TNF (0 , 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg: iv) injection. Evans blue (50 mg/kg) was administered 80 min after rH-TNF injection. The tumors were photoed and were immediately removed 10 min after the Evans blue injection.

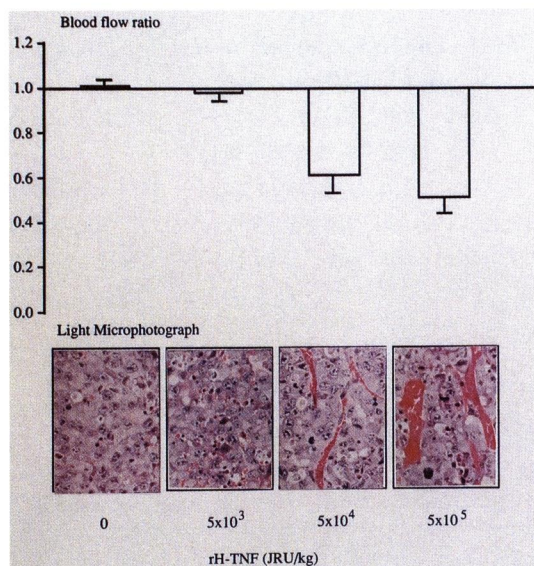


Fig. 9 Comparison of blood flow rate (upper) and light microphotographic appearance (lower) of Meth-A tumors following rH-TNF (0.5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg: iv) injection. The tumors were removed 2h after rH-TNF injection. Blood flow in the other tumors following rH-TNF injection at the same time was measured with a laser flowmeter.

響を検討した (Fig. 12, 13). rH-TNF 単独投与群は正常皮膚の血流量に影響を与えなかった. Hyperthermia 単独施行群では, 開始 30 分後に血流量は約 1.4 倍に増加したが施行終了後には速やかに正常レベルに戻った. 両者の併用群においても, hyperthermia の単独施行群と差異はみられなかった.

3・2・4・3 腫瘍組織での rH-TNF と hyperthermia の併用による血管傷害作用

rH-TNF (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg) 単独, hyperthermia 単独あるいは両者併用が腫瘍内血管透過性を増加するか否かについて検討した (Fig. 14, 15).

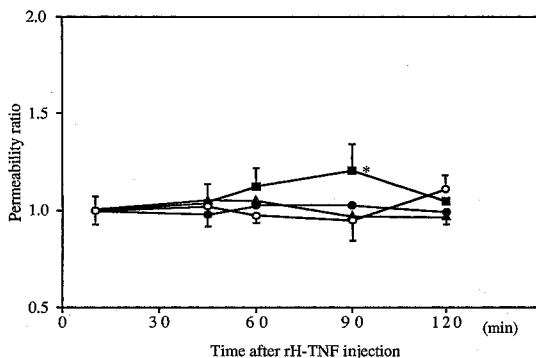


Fig. 10 Vascular permeability in normal dermis following rH-TNF i.v. injection. rH-TNF doses (JRUs/kg): ○, 0; ●, 5×10^3 ; ▲, 5×10^4 ; ■, 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice. * $P < 0.05$; by Student's t test in comparison with the 0 JRUs/kg value.

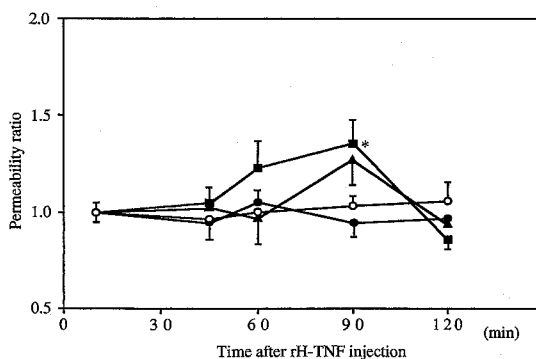


Fig. 11 Vascular permeability in normal dermis with rH-TNF i.v. injection and hyperthermia. rH-TNF doses (JRUs/kg): ○, 0; ●, 5×10^3 ; ▲, 5×10^4 ; ■, 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice. * $P < 0.05$; by Student's t test in comparison with the 0 JRUs/kg value.

rH-TNF (5×10^3 JRUs/kg) 単独投与は腫瘍内血管透過性に変化を与えなかったが, rH-TNF (5×10^4 JRUs/kg) では 60 分後, 90 分後には投与前に比べそれぞれ 1.03 倍, 1.27 倍に, rH-TNF (5×10^5 JRUs/kg) では 60 分後, 90 分後にそれぞれ 1.27 倍, 1.35 倍に増加し, 投与 120 分後には投与前のレベルに回復していた. Hyperthermia 単独施行群では腫瘍内血管透過性に変化はみられなかった. 一方, rH-TNF (5×10^3 JRUs/kg) と hyperthermia の併用群では血管透過性に変化は

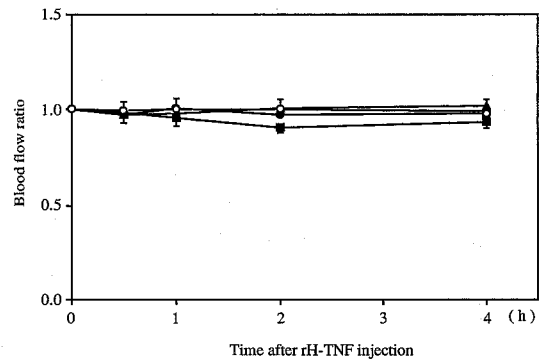


Fig. 12 Blood flow in normal dermis following rH-TNF i.v. injection. Blood flow in the left abdominal dermis of the Meth-A tumor-bearing BALB/c mice was measured with a laser flowmeter following rH-TNF injection. rH-TNF doses (JRUs/kg): ○, 0; ●, 5×10^3 ; ▲, 5×10^4 ; ■, 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice.

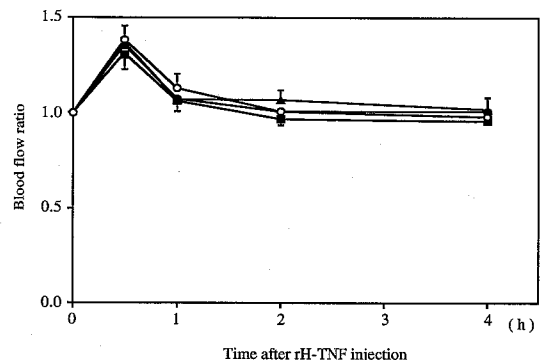


Fig. 13 Blood flow in normal dermis following rH-TNF i.v. injection and hyperthermia. Blood flow in the left abdominal dermis of the Meth-A tumor-bearing BALB/c mice was measured with a laser flowmeter following rH-TNF injection and immersion in water at 40°C . rH-TNF doses (JRUs/kg): ○, 0; ●, 5×10^3 ; ▲, 5×10^4 ; ■, 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice.

みられなかったものの、rH-TNF (5×10^4 JRU/kg) と hyperthermia の併用群では 60 分後、90 分後には投与前に比べそれぞれ 1.23 倍、1.44 倍、rH-TNF (5×10^5 JRU/kg) と hyperthermia の併用群では 60 分後、90 分後にそれぞれ 1.31 倍、1.65 倍と著明に増加していた。

次に、rH-TNF (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 JRU/kg) あるいは hyperthermia が腫瘍内血流量に与える影響を検討した (Fig. 16, 17). rH-TNF (5×10^3 JRU/kg) 単独投与では血流量に変化はみられなかったが、rH-TNF (5×10^4 JRU/kg) 単独投与では 0.5, 1, 2, 4 時

間後には投与前に比べてそれぞれ 0.87, 0.75, 0.60, 0.46 と、時間依存的に低下した。rH-TNF (5×10^5 JRU/kg) 単独投与では血流量は rH-TNF (5×10^4 JRU/kg) に比べさらに低下していた。また、hyperthermia 単独施行群では血流量の変化はみられなかった。一方、rH-TNF (5×10^4 JRU/kg) と hyperthermia の併用群では、血流量は 0.5, 1, 2, 4 時間後にはそれぞれ 0.66, 0.57, 0.35, 0.31 となり、rH-TNF 単独施行群に比べ著明に低下していた。この血流量低下の増強は、rH-TNF (5×10^5 JRU/kg) と hyperthermia の併用群でも認められ、4 時間後にはほぼ完全に血流が停止

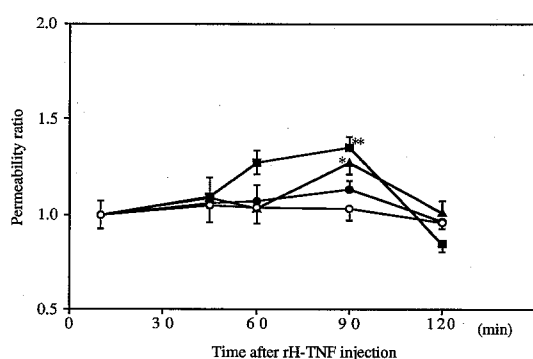


Fig. 14 Vascular permeability in Meth-A tumors following rH-TNF i.v. injection. rH-TNF doses (JRUG/kg): \circ , 0; \bullet , 5×10^3 ; \blacktriangle , 5×10^4 ; \blacksquare , 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; by Student's t test in comparison with the 0 JRUG/kg value.

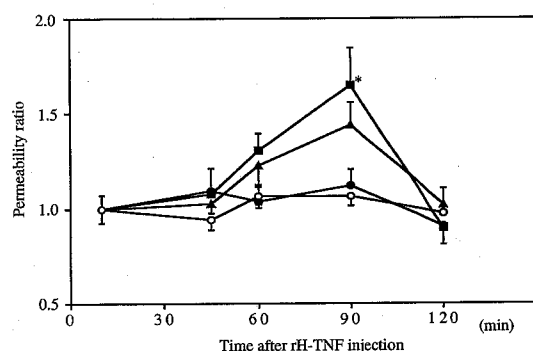


Fig. 15 Vascular permeability in Meth-A tumors with rH-TNF i.v. injection and hyperthermia. rH-TNF doses (JRUG/kg): \circ , 0; \bullet , 5×10^3 ; \blacktriangle , 5×10^4 ; \blacksquare , 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice. * $P < 0.05$; by Student's t test in comparison with the 0 JRUG/kg value.

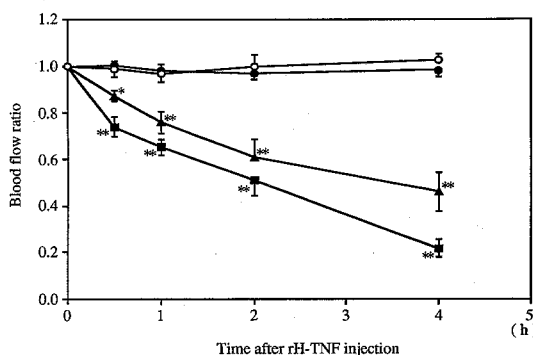


Fig. 16 Blood flow in Meth-A tumors following rH-TNF i.v. injection. rH-TNF doses (JRUG/kg): \circ , 0; \bullet , 5×10^3 ; \blacktriangle , 5×10^4 ; \blacksquare , 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; by Student's t test in comparison with the 0 JRUG/kg value.

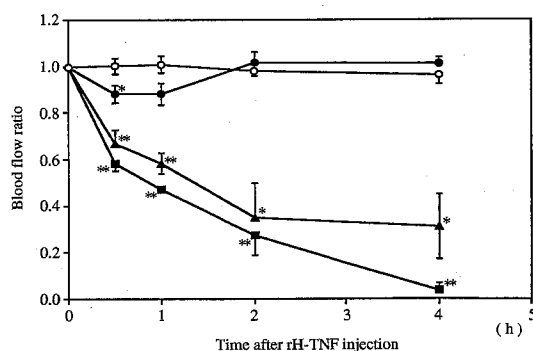


Fig. 17 Blood flow in Meth-A tumors following rH-TNF i.v. injection and hyperthermia. Blood flow in the tumor was measured with a laser flowmeter. rH-TNF doses (JRUG/kg): \circ , 0; \bullet , 5×10^3 ; \blacktriangle , 5×10^4 ; \blacksquare , 5×10^5 . Plots, mean \pm SE (bars) of 5 mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; by Student's t test in comparison with the 0 JRUG/kg value.

した。

4 考 察

rH-TNF は強力な抗腫瘍性を有する anticancer monokine である⁵⁾。しかし、rH-TNF の全身投与では発熱、血圧低下などの副作用^{15,16)} のため、動物実験から換算して効果を期待できる量の rH-TNF の投与が出来ず、満足すべき効果が得られていない。そこで、本研究では、rH-TNF の抗腫瘍効果の増強を目指し、rH-TNF と hyperthermia の併用療法を *in vitro* および *in vivo* で試みた¹⁻⁴⁾。

L-M 細胞に対する rH-TNF の細胞傷害性は、単独では細胞傷害性を引き起こさない 38.5°C 培養を 6, 12 時間併用することにより、37°C 培養に比べ相乗的に高まった。同様に、マウス皮内に移植した Meth-A 腫瘍に対する rH-TNF の抗腫瘍効果や、マウス尾静脈から投与した Meth-A F15 細胞の肺転移に対する rH-TNF の抑制効果も、単独では影響がみられない hyperthermia (40°C, 30 min) を併用することにより、相乗的に高まることが示された。

そこで、さらに、rH-TNF と hyperthermia の併用による抗腫瘍性相乗効果の機序の解析を行った。

rH-TNF による細胞傷害性は、rH-TNF が腫瘍細胞表面に存在する TNF receptor²¹⁾ と結合後、signal transduction を惹起し、結果として hydroxyl radical 産生や lysosomal enzyme の活性化のような細胞致死反応を引き起こす^{22-24,44,45)} ことにより発揮される。

まず、加温 (38.5°C) を併用したときの rH-TNF の kinetics を調べたところ、加温を併用しても TNF receptor 数の変化はみられなかったが、培養開始 5, 10 分後に rH-TNF の細胞外排出量が有意 ($p < 0.05$) に増加していたことから、加温により rH-TNF の internalization が速まることが示された。

次に、rH-TNF と加温を併用したときに、hydroxyl radical 産生および lysosomal enzyme の活性化が rH-TNF 単独あるいは加温単独の場合に比べて増強されているか否かについて検討した。この結果、これらの反応は、rH-TNF 単独あるいは加温単独施行で高まり、両者を併用することによりさらに増強された。

すなわち、rH-TNF と加温の併用による細胞傷害性相乗効果は、rH-TNF の internalization が促進されることと、rH-TNF の細胞致死反応である hydroxyl radical 産生や lysosomal enzyme の活性化が増強することにより発揮されることが示された。

これらの *in vitro* の結果より、*in vivo* における rH-

TNF と hyperthermia の併用による抗腫瘍性相乗効果の機序の 1 つとして、直接的な細胞傷害性が相乗的に増強していることが示唆された。

ところが、rH-TNF による抗腫瘍性効果の機序には、腫瘍細胞に対する直接的な傷害性だけでなく、腫瘍血管の傷害を介した作用も関与している^{40,43)}。すなわち、Meth-A 細胞皮内移植マウスに rH-TNF を尾静脈内投与すると、腫瘍血管が傷害を受け、腫瘍血管の充血、出血が起こることが知られていて、このことから、腫瘍内血流量が低下し、腫瘍への酸素および栄養の供給や老廃物の排除が妨げられて、腫瘍細胞が死滅することが推測される。

今回、血管傷害性を定量的に測定する目的で、色素抽出法およびレーザー血流量計による血流測定法を用いた。まず、予備的に色素抽出法および血流測定法が、腫瘍血管透過性と血流量を定量的に反映するか否かを病理学的に検討した。その結果、rH-TNF によって起こる腫瘍血管透過性の亢進と血流量の低下は、それぞれ肉眼的な透過性の亢進や病理組織像での充鬱血の発現の増加によく一致していた。すなわち、腫瘍血管透過性と血流量を測ることにより、血管傷害の程度を定量的に測定できることが示唆された。

そこで、まず、正常皮膚組織における rH-TNF あるいは hyperthermia の血管傷害に与える影響を調べた。この結果、血管透過性は、hyperthermia 単独では影響がみられなかったものの、rH-TNF 単独投与により亢進がみられ、両者の併用では相乗的に亢進が増強された。すなわち、rH-TNF 投与により正常組織の血管傷害が起こり、hyperthermia 併用によりさらに高まるという可能性があることは否定できない。しかし、血管傷害が起こった状態である血流量低下作用が、rH-TNF 単独群、hyperthermia 単独群および両者併用群のいずれにおいても認められなかったことから、今回用いた rH-TNF あるいは hyperthermia 施行では、血管傷害は起こらなかったと考えられた。

次に、rH-TNF あるいは hyperthermia の腫瘍内血管傷害に与える影響を調べた。この結果、単独では影響を与えない hyperthermia を併用することにより、腫瘍内血流量低下作用および腫瘍血管透過性亢進作用は rH-TNF 単独時に比べ相乗的に増強した。正常組織ではみられなかった rH-TNF 投与による血管傷害が腫瘍組織でみられた理由として、腫瘍血管と正常血管では rH-TNF receptor²¹⁾ の数が違っている可能性が考えられる。さらに、hyperthermia がこの血管傷害を増強した理由として、腫瘍血管が正常血管に比べて血管構造

が脆弱で、不規則な屈曲が多いために、hyperthermia 施行の後に熱拡散が起りにくく温度が低下しにくい^{46,47)}ことも関与していると推察される。

以上の結果から、rH-TNF と hyperthermia の併用による抗腫瘍性相乗効果の機序として、腫瘍細胞に対する直接的な傷害作用の増強だけでなく、腫瘍血管に傷害を与えて間接的に抗腫瘍性を発揮するという作用も増強していることが考えられた。

最近、Maeda ら⁴⁸⁾は、rH-TNF と hyperthermia を併用することにより、hepatocellular carcinoma の患者において、58.1%の腫瘍縮小 (partial response) という有効な結果が得られたことを報告している。今回の実験結果やこの臨床報告⁴⁸⁾から、rH-TNF と hyperthermia の併用は、rH-TNF の抗腫瘍効果を増強し、さらに臨床応用を行う上で有効な方法であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、後校閲をいただきました医学部内科学第4講座新津洋司郎教授に深謝致します。併せて、貴重な御助言を賜りました医学部附属病院検査部渡辺直樹教授に深謝致します。さらに、御協力いただきました医学部内科学第4講座の諸先生に感謝いたします。

参考文献

1. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Synergistic cytotoxic and antitumor effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia. *Cancer Res* 1988, 48: 650-653.
2. Niitsu Y, Watanabe N, Umeno H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Synergistic effects of recombinant human tumor necrosis factor and hyperthermia on in vitro cytotoxicity and artificial metastasis. *Cancer Res* 1988, 48: 654-657.
3. Yamauchi N, Watanabe N, Maeda M, Okamoto T, Sasaki H, Tsuji N, Tsuji Y, Umeno H, Akiyama S, Niitsu Y. Mechanism of synergistic cytotoxic effect between tumor necrosis factor and hyperthermia. *Jpn J Cancer Res* 1992, 83: 540-545.
4. Umeno H, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji N, Okamoto T, Niitsu Y. Enhancement of blood stasis and vascular permeability in Meth-A tumors by administration of hyperthermia in combination with tumor necrosis factor. *Jpn J Cancer Res* 1994, 85: 325-330.
5. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975, 72: 3666-3670.
6. Shirai T, Yamaguchi H, Ito H, Todd CW, Wallace RB. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for human tumor necrosis factor. *Nature* 1985, 313: 803-806.
7. Fransen L, Muller R, Marmenout A, Tavernier J, Van der Heyden J, Kawashima E, Chollet A, Tizard R, Van Heuverswyn H, Van Vliet A, Ruyschaert MR, Fiers W. Molecular cloning of mouse tumor necrosis factor cDNA and its eukaryotic expression. *Nucleic Acids Res* 1985, 13: 4417-4429.
8. Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Umetsu T, Urushizaki I. Antitumor effect of tumor necrosis factor against various primarily cultured human cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1985, 76: 1115-1119.
9. Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 1975, 258: 731-732.
10. Matthews N, Watkins JF. Tumor-necrosis-factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties. *Br J Cancer* 1978, 38: 302-309.
11. Helson L, Helson C, Green S. Effects of murine tumor necrosis factor on heterotransplanted human tumors. *Exp Cell Biol* 1979, 47: 53-60.
12. Watanabe N, Niitsu Y, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Urushizaki I. Inhibitory effect of tumor necrosis serum on the metastasis of B-16 mouse melanoma cells. *Jpn J Cancer Res* 1985, 76: 989-994.
13. Blick M, Sherwin SA, Rosenblum M, Gutterman J. Phase I study of recombinant tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res* 1987, 47: 2986-2989.
14. Watanabe N, Yamauchi N, Maeda M, Neda H, Tsuji Y, Okamoto T, Tsuji N, Akiyama S, Sasaki H, Niitsu Y. Recombinant human tumor necrosis factor causes regression in patients with advanced malignancies. *Oncology* 1994, 51: 360-365.
15. Creaven PJ, Plager JE, Dupere S, Huben RP, Takita H, Mittelman A, Proefrock A. Phase I clinical trial of recombinant human tumor ne-

- crosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987, 20: 137-144.
16. Kimura K, Taguchi T, Urushizaki I, Ohno R, Abe O, Furue H, Hattori T, Ichihashi H, Inoguchi K, Majima H, Niitani H, Ota K, Saito T, Suga S, Suzuoki Y, Wakui A, Yamada K. Phase I study of recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Chemother Pharmacol* 1987, 20: 223-229.
 17. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumor necrosis factor and their regulation by γ -interferon. *Nature* 1985, 318: 665-667.
 18. Tsujimoto M, Vilcek J. Tumor necrosis factor-receptors in HeLa cells and their regulation by interferon- γ . *J Biol Chem* 1986, 261: 5384-5388.
 19. Watanabe N, Niitsu Y, Yamauchi N, Umeno H, Sone H, Neda H, Urushizaki I. Antitumor synergism between recombinant human tumor necrosis factor and recombinant human interferon- γ . *J Biol Response Mod* 1988, 7: 24-31.
 20. Regenass U, Muller M, Curschellas E, Matter A. Anti-tumor effects of tumor necrosis factor in combination with chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* 1987, 39: 266-273.
 21. Watanabe N, Kuriyama H, Sone H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Niitsu Y. Continuous internalization of tumor necrosis factor receptors in a human myosarcoma cell line. *J Biol Chem* 1988, 263: 10262-10266.
 22. Watanabe N, Niitsu Y, Neda H, Sone H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Cytocidal mechanism of TNF: effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibitors on cytotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1988, 10: 109-116.
 23. Yamauchi N, Kuriyama H, Watanabe N, Neda H, Maeda M, Niitsu Y. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 1989, 49: 1671-1675.
 24. Yamauchi N, Watanabe N, Kuriyama H, Neda H, Maeda M, Himeno T, Tsuji Y, Niitsu Y. Suppressive effects of intracellular glutathione on hydroxyl radical production induced by tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 1990, 46: 884-888.
 25. Storm FK, Kaiser LR, Goodnight JE, Harrison WH, Elliott RS, Gomes AS, Morton DL. Thermochemotherapy for melanoma metastasis in liver. *Cancer* 1982, 49: 1243-1248.
 26. Falk RE, Moffat FL, Lawler M, Heine J, Makowka L, Falk JA. Combination therapy for resectable and unresectable adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer* 1986, 57: 685-688.
 27. Yamazaki S, Onishi E, Enami K, Natori K, Kohase M, Sakamoto H, Tanouchi M, Hayashi H. Proposal of standardized methods and reference for assaying recombinant human tumor necrosis factor. *Jpn J Med Sci Biol* 1986, 39: 105-118.
 28. Geran RI, Greenberg NH, Macdonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (third edition): test evaluation protocol 11. *Cancer Chem Rep Part 3* 1972, 3: 47-52.
 29. Fekete E. A comparative morphological study of the mammary gland in a high and a low tumor strain of mice. *Am J Pathol* 1938, 14: 557-578.
 30. Wexler H. Accurate identification of experimental pulmonary metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1966, 36: 641-645.
 31. Bolton AE, Hunter WM. The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. *Biochem J* 1973, 133: 529-539.
 32. Rosenthal HE. A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* 1967, 20: 525-532.
 33. Yonehara S, Ishii A, Yonehara-Takahashi M. Cell surface receptor-mediated internalization of interferon: its relation to the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol* 1983, 64: 2409-2418.
 34. Miskimins WK, Shimizu N. Dual pathways for epidermal growth factor processing after receptor-mediated endocytosis. *J Cell Physiol* 1982, 112: 327-338.
 35. Shibko S, Tappel AL. Rat-kidney lysosomes: isolation and properties. *Biochem J* 1965, 95: 731-741.
 36. Kato K, Yoshida K, Tsukamoto H, Nobunaga M, Masuya T, Sawada T. Synthesis of p-nitrophenyl β -D-glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for the assay of β -glucuronidase activity. *Chem Pharm Bull* 1960, 8: 239-242.
 37. Repine JE, Eaton JW, Anders MW, Hoidal JR, Fox RB. Generation of hydroxyl radical by enzymes, chemicals, and human phagocytes in vitro: Detection with the anti-inflammatory

- agent, dimethyl sulfoxide. *J Clin Invest* 1979, 64: 1642-1651.
38. Aukland K, Bower BF, Berliner RW. Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ Res* 1964, 14: 164-187.
39. Sohmura Y, Nakata K, Yoshida H, Kashimoto S, Matsui Y, Furuichi H. Recombinant human tumor necrosis factor. 2. Antitumor effect on murine and human tumors transplanted in mice. *Int J Immunopharmacol* 1986, 8: 357-368.
40. Watanabe N, Niitsu Y, Umeno H, Kuriyama H, Neda H, Yamauchi N, Maeda M, Urushizaki I. Toxic effect of tumor necrosis factor on tumor vasculature in mice. *Cancer Res* 1988, 48: 2179-2183.
41. Brett J, Gerlach H, Nawroth P, Steinberg S, Godman G, Stern D. Tumor necrosis factor/cachectin increases permeability of endothelial cell monolayers by a mechanism involving regulatory G proteins. *J Exp Med* 1989, 169: 1977-1991.
42. Gerlach H, Lieberman H, Bach R, Godman G, Brett J, Stern D. Enhanced responsiveness of endothelium in the growing/motile state to tumor necrosis factor/cachectin. *J Exp Med* 1989, 170: 913-931.
43. Kawai T, Satomi N, Sato N, Sakurai A, Haranaka K, Goto T, Suzuki M. Effects of tumor necrosis factor (TNF) on transplanted tumors induced by methylcholanthrene in mice. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 1987, 52: 489-500.
44. Suffys P, Beyaert R, Van Roy F, Fiers W. Reduced tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by inhibitors of the arachidonic acid metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 149: 735-743.
45. Matthews N, Neale ML, Jackson SK, Stark JM. Tumor cell killing by tumor necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 1987, 62: 153-155.
46. Rogers W, Edlich RF, Lewis DV, Aust JB. Tumor blood flow: I. Blood flow in transplantable tumors during growth. *Surg Clin North Am* 1967, 47: 1473-1482.
47. Reinhold HS. Improved microcirculation in irradiated tumors. *Eur J Cancer* 1971, 7: 273-280.
48. Maeda M, Watanabe N, Yamauchi N, Tsuji Y, Niitsu Y. Successful treatment of a case of hepatocellular carcinoma with tumor necrosis factor and local hyperthermia. *Gastroenterol Jpn* 1991, 26: 774-778.
-
- 別刷請求先：
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学医学部内科学第4講座 梅野 寛